

溴氰菊酯中毒引起家蝇神经系统 环腺苷酸(cAMP)含量的改变*

罗 远 张 宗 炳

(中国科学院动物研究所) (北京大学生物系)

摘要 环腺苷酸(cAMP)可在神经传递物刺激腺苷酸环化酶的作用下产生,而环腺苷酸又可促成神经传递物的产生。用溴氰菊酯(deltamethrin)处理家蝇后,发现酪胺大量增加,主要由于酪氨酸脱羧酶受到诱导、活性增高所致。处理后一小时,cAMP也有增加,并与酶活性的增加相平行,但酪氨酸脱羧酶活性增高的曲线与cAMP量增加的曲线,实际上并不平行,因酪氨酸脱羧酶的活性是先增加,然后下降,而cAMP的量则是在开始时有一个小的下降,接着一直上升,而此时酶的诱导已下降。cAMP含量在诱导开始时出现下降的原因尚不明,可能与环鸟苷酸(cGMP)有关。但随后的上升显然是由于酪胺或章鱼胺的增加所造成。目前已证实,酪胺可经 β -羟化作用形成章鱼胺,后者再刺激章鱼胺受体,而使腺苷酸环化酶活化,产生大量的cAMP。酪胺本身也可能就是章鱼胺受体的激活剂。

关键词 环腺苷酸 酪胺 章鱼胺 溴氰菊酯 家蝇

环腺苷酸(cAMP)对神经系统的冲动传导起着一定的作用(Greengard等,1976)。很多神经轴突释放的神经传递物,都是首先刺激腺苷酸环化酶,引起cAMP含量的增加(Nathanson, 1973)。在哺乳动物的交感神经节之间,cAMP的作用是调节“多巴胺能”的神经传导,从而影响乙酰胆碱的传导作用(Greengard等,1972)。另有报道,很多神经传导物的形成都与cAMP有关,一些神经毒剂,如DDT、溴氰菊酯,可引起小白鼠头部的cAMP及cGMP含量的改变(Aldridge等,1978)。在昆虫中,也发现cAMP与DDT、溴氰菊酯一类神经毒剂的作用有关。因此,搞清cAMP与这些神经毒剂的作用之间的关系,有助于阐明这些神经毒剂的毒理机制。

作者以前曾报道,DDT可引起神经毒素——酪胺的产生(张宗炳等,1984a,1984b),以及诱导相应的酪氨酸脱羧酶(罗远等,1983; 1985),同时还发现,在诱导脱羧酶的过程中,cAMP有相应的增加。本实验应用溴氰菊酯处理的家蝇,重新证实了产生的神经毒素是酪胺,并证实在处理家蝇头部的酪氨酸脱羧酶活性的诱导作用。在酶活性被诱导的同时,又测定了cAMP含量的变化,结果指出,用溴氰菊酯处理后,随着酪氨酸脱羧酶活性的增加,cAMP含量也增加,但中毒时间延长后,酪氨酸脱羧酶的诱导作用虽已结束,cAMP含量的增加反而更为显著。

本文于1984年9月收到。

* 本工作由医学科学院基础所刘景生同志在方法上予以指导;中国科学院动物研究所冷欣夫同志帮助,特此致谢。

本课题承科学基金资助

材 料 与 方 法

一、主要试剂及仪器

L-酪氨酸纯品, E. Merck 产品。

酪胺 $\geq 99\%$, Fluka 产品。

^3H -3,5-L-酪氨酸, 上海原子能所供给。

^3H -cAMP; 标准 cAMP; 蛋白激酶等, 医学科学院基础所供给。

溴氰菊酯 (deltamethrin) 99%, UCLAF 赠送。

微晶型纤维素膜, 浙江黄岩化工厂产品。

液体闪烁计数器, Beckman LS-9800 型。

二、实验昆虫

家蝇成虫 (*Musca domestica vicina*) 是在 27℃ 恒温室自行饲养。

三、方法

1. 溴氰菊酯处理及匀浆的制备

每 40 只家蝇为一个样品组, 分别点滴溴氰菊酯 (0.001mg/ml) 1 μl /昆虫于前胸背板。置 20℃ 1 小时后立即用液氮固定, 取下头部, 放入 1ml 匀浆器中, 加 400 μl Tris-HCl 缓冲液(测酪氨酸脱羧酶时)或加 400 μl 10% 三氯乙酸(提取 cAMP 时)进行匀浆。

2. 酪氨酸脱羧酶活性的测定

参照 Murdock (1973) 及 Hopkins 等(1976)的方法, 并适当修改(罗远等, 1983)。采用标记的底物 ^3H -酪氨酸与上述酶的粗提取液进行反应, 然后用薄膜层析分离转化的产物(酪胺), 并以液体闪烁计数器计数。酶匀浆液用 Folin-酚法测定蛋白含量, 酶活力以每毫克蛋白、每分钟的 cpm 表示(即: cpm/分/mg 蛋白)。

3. cAMP 的提取及测定

将上述组织匀浆液离心 (5,000 转/分, 10 分钟), 取酸性上清液用 5 倍体积水饱和的乙醚洗四次, 除去三氯醋酸, 合并上清液, 蒸干乙醚。测定前以一定量缓冲液溶解, 即可直接进行测定 (Hopkins, 1976)。cAMP 测定方法, 采用氚标记的放射免疫测定法(王世真等, 1975)。标准 cAMP 或样品分别加入 ^3H -cAMP、蛋白激酶, 置 0—4℃ 反应 3 小时, 反应后加入吸附剂离心 (3,000 转/分, 6 分钟), 取上清液 200 μl 加入闪烁液进行测定, 进一步求出结合率 (Co/Cx)。以 Co/Cx 对不同浓度的标准 cAMP (pmol) 作标准曲线, 测定范围为 0.25—16.0 pmol/50 μl 。样品的 cAMP 含量可以从标准曲线读出, 并换算成 pmol cAMP/mg 蛋白。

结 果 与 讨 论

1. 溴氰菊酯处理后家蝇头部 cAMP 含量的变化

家蝇经溴氰菊酯处理 1 小时, 测定头部 cAMP 含量, 对照组为 3.45 pmol/mg 蛋白, 处理组 6.68 pmol/mg 蛋白。

随着中毒时间的延长, cAMP 含量不断增加。表 1 及图 1 示药物处理后不同时间内家蝇头部 cAMP 含量与对照组含量的比较, 说明处理后不同时间内, 家蝇脑中 cAMP 含

量的变化情况。

表 1 不同中毒时间内 cAMP 含量的变化

处理时间(小时)	cAMP 含量 (pmol/mg 蛋白)
对照	0.80±1.2
0	0.91±0.8
0.25	0.65±0.6
0.50	1.69±0.9
1.0	1.95±1.4
2.0	2.21±0.8
4.0	6.50±0.7
6.0	9.75±1.3
8.0	12.10±0.9

表中数据为四次实验平均值。

上列数据表明,家蝇用溴氰菊酯处理后,头部的 cAMP 含量即增加。从图 1 可知,在测试的时间(8 小时)内,经 0.5 小时,出现一下降(这一下降的原因尚不明),0.5 小时后则一直上升,未出现下降情况,这与下面观察到的酪氨酸脱羧酶的活性变化,有明显的不同。

2. 溴氰菊酯处理对酪氨酸脱羧酶的诱导作用。

罗远等(1983;1985)以前报道,曾观察到 DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用,并认为 DDT 对此酶活性的诱导,是产生神经毒素酪胺的一个重要步骤。在溴氰菊酯的研究中,同样观察到溴氰菊酯对家蝇神经系统中酪氨酸脱羧酶的影响,且更为显著。本实验试图找出酪氨酸脱羧酶的诱导与 cAMP 含量增加之间的关系。用溴氰菊酯处理后 1 小时,再以氘标记的酪氨酸测定酪氨酸脱羧酶的活性,从多次测定结果可以看出,正常家蝇头部的酪氨酸脱羧酶活性低于溴氰菊酯处理后的家蝇,二者相差约 3.3 倍,比 DDT 对此酶的诱导倍数更高。这一结果证实了我们以前的报道,即 DDT 中毒的美洲蜉蝣对酪氨酸脱羧酶有诱导作用,并证实了,在处理 1 小时时,酪氨酸脱羧酶与 cAMP 同时增加。进一步观察了不同中毒时间对酪氨酸脱羧酶诱导的情况,结果列于表 2 及图 2。

表 2 不同中毒时间内酪氨酸脱羧酶活性的变化

处理后时间(小时)	酪氨酸脱羧酶活性(cpm/分钟/mg 蛋白)
对照	46.5±1.3
0	44.2±8.3
0.5	69.5±8.5
1.0	105.3±4.7
2.0	98.9±2.3
4.0	31.5±3.5

表中数据为两次实验平均值。

由此可见,溴氰菊酯中毒的家蝇,及 DDT 中毒的蜉蝣,神经系统酪氨酸脱羧酶的诱导情况是相似的。溴氰菊酯对家蝇酪氨酸脱羧酶的诱导,在不同中毒时间内也呈现一定的规律。中毒后 0.5 小时,酶活性即出现上升,在 1—1.5 小时出现高峰值,随后逐渐下降。但是,将图 1 与图 2 比较,可见 cAMP 的增加趋势与酪氨酸脱羧酶的诱导作用并不相符,

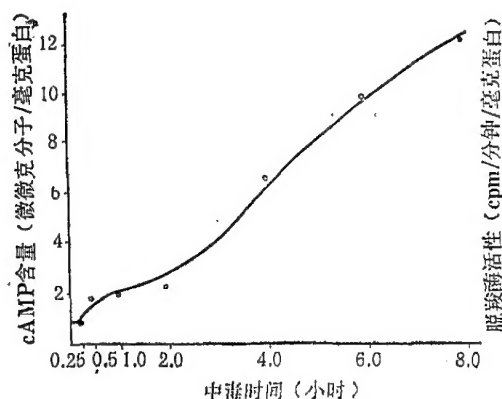


图 1 不同中毒时间内家蝇头部 cAMP 含量的变化

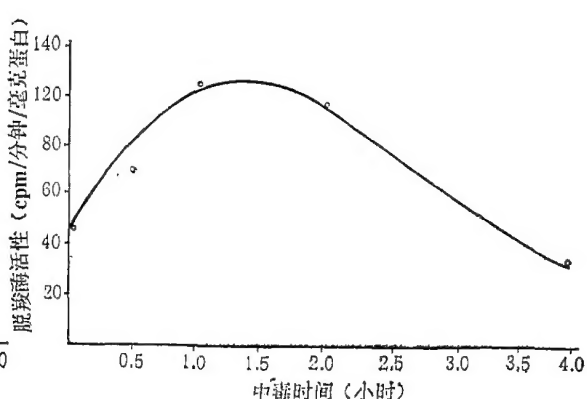


图 2 不同中毒时间内酪氨酸脱羧酶活性的变化

也就是存在有上述的两点不同。

溴氰菊酯诱导昆虫神经系统中的酪氨酸脱羧酶后, 可能通过产生的酪胺使章鱼胺含量也增加(已有试验证明, 酪胺可通过 β -羟化作用形成章鱼胺, 将在另文报道)。这些正常的及不正常的神经传递物都会刺激腺苷酸环化酶, 而使 cAMP 增加, 因此, cAMP 的含量在后期逐渐增加, 很可能是由于酪胺及章鱼胺等增加的结果。由图 1 与图 2 的比较, 说明了溴氰菊酯诱导酪胺的显著增加先于 cAMP 的显著增加, 这可能是引起 cAMP 含量改变的原因。相反地, cAMP 的增加依然可能是引起酪氨酸脱羧酶活性增加的原因, 但目前看来, 可能性不大。杀虫药剂及电刺激都可直接通过改变膜电位, 影响膜上受体而刺激腺苷酸环化酶, 造成 cAMP 含量的改变。cAMP 含量的改变可以引起昆虫一系列神经生理的改变, 很可能与神经毒剂的毒理机制有密切的关系。

关于 cAMP 含量在诱导起始时有一个小的下降, 推测可能与 cGMP 有关。cGMP 也同样与神经传递物的作用相关, 并且在一般情况下与 cAMP 有协同作用。因此, DDT 及溴氰菊酯有可能先引起 cGMP 的增加, 而后来出现的 cAMP 的增加, 乃是由于酪胺及章鱼胺所导致。我们将进一步研究各种杀虫药剂, 特别是 DDT、溴氰菊酯等对于 cGMP 含量的影响。

参 考 文 献

- 张宗炳、吴士雄等 1984a 昆虫神经毒素的研究: 酪胺作为 DDT 麻痹的雄蝇血淋巴中的毒素。昆虫学报 27(1): 15—22。
- 张宗炳、吴士雄、程念胜、姚逸红 1984b 昆虫神经毒素的研究: 各种神经毒剂引起毒素的产生。昆虫学报 27(2): 165—72。
- 罗远、张宗炳 1983 DDT 对美洲雄蝇 L-酪氨酸脱羧酶的诱导作用 I。科学通报 14: 896。
- 罗远、倪逸声、张宗炳、1985 昆虫神经毒素的研究: DDT 对美洲雄蝇 L-酪氨酸脱羧酶的诱导作用。昆虫学报 28(3): 241—3。
- 王世真等 1975 放射免疫分析及其他放射体外测定方法。原子能出版社。p. 228。
- Aldridge, W. N. et. al. 1978 The effect of DDT and the pyrethroids cismethrin and decamethrin on the acetylcholine and cyclic nucleotide content of rat brain. *Biochemical Pharmacology* 27: 1703。
- Greengard, P. 1976 Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. *Nature* 260: 101。
- Greengard, P. et. al. 1972 *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1: 373。

- Hopkins, T. L. and L. L. Murdock, 1976 Dopa and tyrosine decarboxylase activity in tissues of cockroach in relation to cuticle formation and ecdysis, *J. Insect Physiol.* 22: 1167.
- Murdock, L. L. 1973 3,4-Dihydroxyphenylamine (dopa) decarboxylase activity in the Arthropod nervous system. *Biochemical J.* 132: 681.
- Nathanson, J. A. 1973 Octopamine-sensitive adenylate cyclase: evidence for a biological role of octopamine in nervous system. *Science* 180: 308.

CHANGES OF cAMP CONTENT IN HOUSEFLY NERVOUS SYSTEM DURING DELTAMETHRIN POISONING

LUO YUAN

(Institute of Zoology Academia Sinica)

J. T. CHANG

(Department of Biology Peking University)

Adenosine 3', 5' monophosphate (cAMP) play an important role in animal nervous system, where it seems to involve in many intracellular interactions and participate in certain types of communications between nerve cells. Recently, it has been reported that DDT and some pyrethroids changed the acetylcholine, cAMP and cGMP contents of the brain after treating rats in doses which induce convulsive tremors. In insects, changes of cAMP was also found to be related with certain neurotoxic insecticides.

We have reported that tyramine is the neurotoxin released by DDT-poisoned cockroaches, and tyrosine decarboxylase is induced after DDT treatment. Also, we have found the amount of cAMP increases during the induction of tyrosine decarboxylase. Using deltamethrin as the toxicant and housefly as the test insect, it was confirmed that the toxic substance released by prostrate fly is also possessed of induction of tyrosine decarboxylase. But the changes of cAMP content in the nervous system after treatment with deltamethrin did not run parallel with the induction curve. After deltamethrin treatment, the content of cAMP continued to increase even after the decline of the activity of tyrosine decarboxylase. So, the induction of tyrosine decarboxylase is possibly not the result of the increase of cAMP. On the contrary, the continued increase of cAMP is possibly due to the increase of tyramine or octopamine (β -hydroxylated product of tyramine), which activated octopaminergic receptor and hence adenylate cyclase, thus resulting in the further increase of cAMP. We have confirmed the β -hydroxylation of tyramine into octopamine, which will be reported else where, and are now investigating whether tyramine may act as an agonist of octopamine.

Key words cAMP—tyramine—octopamine—deltamethrin—housefly